



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 195 20 398 A 1**

(51) Int. Cl. 6:
H 01 F 1/00
C 07 H 21/00
C 07 H 1/06
C 03 C 4/00
// B01J 20/02, C07H
21/04, C07K 16/00

(21) Aktenzeichen: 195 20 398.4
(22) Anmeldetag: 8. 6. 95
(43) Offenlegungstag: 12. 12. 96

(71) Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

(72) Erfinder:
Kleiber, Joerg, Dipl.-Biol. Dr., 82377 Penzberg, DE;
Walter, Thomas, Dipl.-Chem. Dr., 83673 Bichl, DE;
Harttig, Herbert, Dipl.-Chem. Dr., 67122 Altrip, DE

(54) Magnetisches Pigment

(57) Magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist sowie ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche sind bevorzugt einsetzbar bei der Isolierung von biologischen Materialien aus Proben. Sie gewähren eine rasche und zuverlässige Reinigung.

DE 195 20 398 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 96 602 050/83

10/27

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind magnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, Verfahren zur Reinigung eines biologischen Materials, insbesondere von Nukleinsäuren unter Verwendung von Glaspartikeln in Gegenwart chaotroper Salze, Verfahren zur Isolierung dieser biologischen Materialien und Verfahren zur Konzentrierung biologischen Materialien und die Überführung von biologischen Materialien aus Lösungen mit hoher Konzentration an Salzen in Lösungen mit niedriger Konzentration an Salzen.

Manche biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, stellen im Hinblick auf ihre Isolierung aus der natürlichen Umgebung besondere Anforderungen. Zum einen sind sie oft in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und zum anderen befinden sie sich oft in Nachbarschaft vieler anderer fester und gelöster Substanzen, die ihre Isolierung, beziehungsweise Bestimmung, beeinträchtigen.

In jüngerer Zeit hat es daher nicht an Versuchen gefehlt, Verfahren und Materialien zur Isolierung von Nukleinsäuren aus ihrer natürlichen Umgebung vorzuschlagen. Aus Proc. Natl. Acad. USA 76, 615–619 (1979) ist die Bindung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen in Gegenwart von Natriumjodid in gemahlenem Flintglas beschrieben.

In Anal. Biochem. 121, 382–387 (1982) ist die Reinigung von Plasmid DNA aus Bakterien an Glasstaub in Gegenwart von Natriumperchlorat beschrieben.

In DE-A 37 34 442 ist die Isolierung von einzelsträngiger M13 Phagen-DNA an Glasfaserfiltern durch Ausfällung der Phagenpartikel mit Hilfe von Essigsäure und Lyse der Phagenpartikel mit Perchlorat beschrieben. Die an die Glasfaserfilter gebundenen Nukleinsäuren werden nach Waschen mit einem methanolhaltigen Puffer in Tris/EDTA-Puffer eluiert.

In Anal. Biochem. 175, 196–201 (1988) ist ein ähnliches Verfahren zur Reinigung von DNA aus Lambdaphagen beschrieben.

Den bisher genannten Verfahren des Standes der Technik ist die selektive Bindung von Nukleinsäuren an Glasoberflächen in chaotropen Salzlösungen gemeinsam, wobei die Nukleinsäure von Verunreinigungen wie Agarose, Proteinen oder Zelltrümmern abgetrennt wird. Zur Separierung der Glaspartikel von den Verunreinigungen wird nach dem Stand der Technik entweder Zentrifugation von Partikeln oder Durchsaugen von Flüssigkeiten durch Glasfaserfilter verwendet. Hierbei handelt es sich jedoch um einen limitierenden Schritt, der die Verarbeitung solcher Probenzahlen stark behindert.

In Anal. Biochem. 201, 166–169 (1992) bzw. PCT GB 91/00212 ist die Verwendung von Magnetpartikeln zur Immobilisierung von Nukleinsäuren nach Ausfällung durch Zugabe von Salz und Ethanol beschrieben. Hierbei findet eine Agglutination der Nukleinsäuren unter Einschluß der Magnetpartikel statt. Das Aggiutinat wird von dem ursprünglichen Lösungsmittel durch Anlegen eines Magnetfeldes und Waschen getrennt. Nach einem Waschschnitt werden die Nukleinsäuren in einem Trispuffer gelöst. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die Ausfällung nicht selektiv für Nukleinsäuren ist, sondern eine Vielzahl von festen und gelösten Stoffen mitagglutiniert werden. So ist es durch dieses Verfahren nicht möglich, eventuell vorhandene Inhibitoren für bestimmte enzymatische Reaktionen in ausreichendem Maße zu entfernen.

In US-A-4,233,169 ist ein poröses Glas beschrieben, das Magnetpartikel eingelagert enthält.

Auf dem Markt befindet sich derzeit auch sogenanntes magnetisches, poröses Glas, welches Magnetpartikelchen in einer porösen, partikulären Glasmatrix enthält, und wobei die Oberfläche von einer streptavidinhaltigen Schicht überzogen ist. Dieses Produkt kann zur Isolierung von biologischen Materialien, zum Beispiel Proteinen oder Nukleinsäuren verwendet werden, wenn diese in einem aufwendigen Vorbereitungsschritt so modifiziert werden, daß diese kovalent an Biotin gebunden sind.

Aufgabe der Erfindung war es, bessere Materialien zur Innobilisierung von biologischen Materialien und ein einfaches und für die Routine-Diagnostik geeignetes Verfahren zur Isolierung von biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung sind magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Ein weiterer Gegenstand sind ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche, Verfahren zur Isolierung biologischer Materialien, insbesondere von Nukleinsäuren, sowie Verfahren zur Herstellung magnetischer Glaspartikel.

Als Partikel bezeichnet der Fachmann feste Materialien mit einem geringen Durchmesser. Manchmal bezeichnet man solche Partikel auch als Pigmente. Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind besonders Partikel geeignet, die eine durchschnittliche Korngröße von weniger als 100 µm haben. Besonders bevorzugt weisen sie eine durchschnittliche Korngröße von zwischen 10 und 50 µm auf. Bevorzugt ist die Korngrößenverteilung relativ homogen, insbesondere liegen nahezu keine Teilchen < 10 µm oder > 50 µm vor.

Als magnetisch werden Materialien bezeichnet, die durch einen Magnet angezogen werden können, d. h. beispielsweise ferromagnetische oder superparamagnetische Materialien. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind ferromagnetische Materialien, insbesondere wenn sie noch nicht vormagnetisiert wurden. Unter Vormagnetisierung ist in diesem Zusammenhang das Inkontaktbringen mit einem Magneten zu verstehen, wodurch die Remanenz erhöht wird. Besonders bevorzugt sind ferromagnetische Materialien, wie z. B. Magnetit (Fe_3O_4) oder Fe_2O_3 .

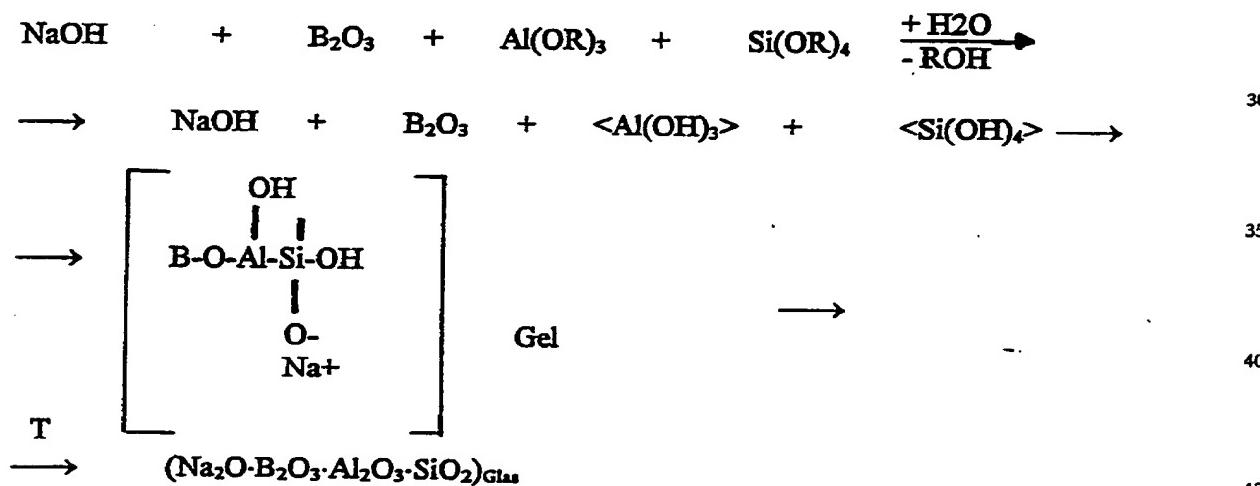
Unter einer äußeren Oberfläche eines Partikels wird die zusammenhängende Oberfläche verstanden, von der in Richtung auf die Umgebung des Partikels Senkrechte gebildet werden können, die dasselbe Partikel nicht noch einmal schneiden.

Unter einer Pore wird eine Ausnehmung in der äußeren Oberfläche des Partikels verstanden, bei denen die Oberfläche soweit in das Partikel hineinreicht, daß eine in der Ausnehmung auf der Oberfläche gebildete gedachte Senkrechte in Richtung auf die nächstliegende Umgebung des Partikels das Partikel mindestens 1 mal schneidet. Poren reichen außerdem tiefer als ein Radius der Pore in das Partikel hinein.

Unter einem Glas im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein siliciumhaltiges amorphes Material verstanden. Das Glas kann weitere Materialien enthaltenen, z. B.

B ₂ O ₃	(0—30%),	5
Ae ₂ O ₃	(0—20%),	
CaO	(0—20%),	
BaO	(0—10%),	
K ₂ O	(0—20%),	
N ₂ O	(0—20%),	
MgO	(0—18%),	10
Pb ₂ O ₃	(0—15%).	

In geringerem Umfang von 0—5% können auch eine Vielzahl anderer Oxide, wie z. B. Mn₂O₃, TiO₂, As₂O₃, Fe₂O₃, CuO, CoO usw. enthalten sein. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Gläser, die durch den sogenannten Gel-Solprozeß und anschließendes Trocknen und Verdichten der gebildeten Schicht gebildet werden. Dieser Prozeß ist in seinen Grundzügen bekannt und wurde z. B. in C.J. Brinker, G.W. Scherer "Sol Gel science — The physics and chemistry of Sol Gel Processing", Academic Press Inc. 1990 und Sol-Gel Optics, Processing and Applications Lisa C. Klein Ed. Kluwer Academic Publishers 1994, Seite 450 ff beschrieben. Er wurde allerdings bisher noch nicht für magnetische Partikel beschrieben. Daß hiermit magnetische Partikel erzeugt werden können, die bei der Isolierung von biologischen Materialien, insbesondere Nukleinsäuren, ganz überraschende Eigenschaften haben, war nicht zu erwarten. Im Gel-Sol-Prozeß werden Alkoxide von netzwerksbildenden Komponenten, z. B. SiO₂, B₂O₃, Al₂O₃, TiO₂, ZrO₂, GeO₂ zusammen mit Oxiden und Salzen anderer Komponenten, z. B. in alkoholischer Lösung, vorgelegt und hydrolysiert. In der Gleichung ist die Herstellung von einem Natriumboroaluminumsilikatglas aufgeführt. 15
20
25



Durch die Zugabe von Wasser wird der Hydrolyseprozeß der Ausgangskomponenten in Gang gesetzt. Die Reaktion verläuft relativ rasch, da die Akalionen katalytisch auf die Hydrolysegeschwindigkeit des Kieseläureesters einwirken. Nach Ablauf der Gelbildung kann das entstehende Gel getrocknet und durch einen thermischen Prozeß zu einem Glas verdichtet werden. 50

Unter einer im wesentlichen porenfreien Oberfläche wird eine Oberfläche verstanden, die zu weniger als 5%, bevorzugt weniger als 2%, besonders bevorzugt weniger als 0.1%, mit Poren der oben stehenden Definition durchsetzt ist. Sollten Poren vorhanden sein, so haben diese bevorzugt einen Durchmesser von weniger als 10 nm, besonders bevorzugt 1 nm.

Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung sind Partikel, die einen Kern aus Glimmer und darauf immobilisierten Magnetitpartikeln enthalten, wobei der so gebildete Verbundstoff von der Glasschicht umschlossen ist. Sowohl der Kern als auch die Magnetitpartikel sind kristallin und nicht porös. Die Räume auf der Oberfläche des Glimmers, welche nicht von den Magnetitpartikeln besetzt ist, sind von einer dickeren Glasschicht überzogen als die Spitzen der Magnetitpartikel, so daß sich eine im wesentlichen nicht-poröse Glasoberfläche ergibt. 55

Die Nichtporosität der magnetischen Partikel bezieht sich nur auf die äußere Oberfläche, nicht auf das Innere des Partikels, so daß das Partikel in seinem Inneren porös sein kann, wenn die Oberfläche nur von im wesentlichen porenfreiem Glas oder einer Glasoberfläche mit Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm umschlossen ist.

Überraschenderweise sind die erfundungsgemäßen magnetischen Partikel besonders vorteilhaft zur Isolierung biologischer Materialien aus Proben geeignet. Insbesondere werden lange Nukleinsäuren sehr wenig oder gar nicht zerstört, wenn sie daran immobilisiert werden. Das Material des Kerns ist darüber hinaus eine natürliche Ressource und somit ökologisch wenig bedenklich. Die Herstellung der erfundungsgemäßen Partikel ist darüber hinaus sehr wenig aufwendig und kostengünstig. 60
65

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche. Im Stand der Technik sind superparamagnetische Partikel beschrieben. Es hat sich nun herausgestellt, daß ferromagnetische Partikel, wenn sie mit einer Glasoberfläche überzogen sind, erhebliche Vorteile bei der Isolierung von biologischen Materialien aufweisen.

5 Solange die ferromagnetischen Partikel noch keinem Magnetfeld ausgesetzt waren, sedimentieren sie ausschließlich unter Einfluß der Schwerkraft. Sie sind durch Schütteln einfach und schnell wieder zu suspendieren. Der Vorgang der Abscheidung ohne Magnetfeldeinfluß verläuft dabei deutlich langsamer als die Immobilisierung biologischer Materialien an ihrer Oberfläche. Dies gilt insbesondere für Nukleinsäuren. Die ferromagnetischen Partikel können auf einfache Weise mittels eines Magneten an einer bestimmten Stelle der Probenflüssigkeit gesammelt werden, um die Flüssigkeit von den Partikeln und somit den immobilisierten biologischen Materialien zu trennen.

10 Die Glasoberfläche der erfundungsgemäßen ferromagnetischen Partikel kann porenfrei sein oder aber Poren enthalten. Aus den oben genannten Gründen für die erfundungsgemäßen magnetischen Partikel ist es bevorzugt, daß die äußere Oberfläche auch der ferromagnetischen Partikel im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10 nm aufweist. Auch die erfundungsgemäßen ferromagnetischen Partikel haben bevorzugt eine Korngröße zwischen 10 und 50 µm. Besonders bevorzugt sind Partikel, bei denen eventuell in der Oberfläche vorhandene Poren einen Durchmesser von weniger als 10, besonders bevorzugt 1 nm haben. Ein Beispiel für einen erfundungsgemäßen ferromagnetischen Partikel ist der oben genannte Verbundstoff aus Glimmer- und Magnetitpartikeln, umschlossen von einer Glasschicht.

15 20 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung eines biologischen Materials durch

- Inkontaktbringen einer Probe, die das biologische Material in einer Flüssigkeit enthält, mit den erfundungsgemäßen magnetischen Partikeln oder den erfundungsgemäßen ferromagnetischen Partikeln unter Bedingungen, bei denen das biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, und
- Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit.

25 Unter biologischen Materialien werden Materialien auf partikulärer oder molekularer Basis verstanden. Hierzu gehören insbesondere Zellen, z. B. Viren und Bakterien aber auch humane und tierische isolierte Zellen, wie Leukozyten, sowie immunologisch aktive nieder- und hochmolekulare chemische Verbindungen, wie Haptene, Antigene, Antikörper und Nukleinsäuren. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, z. B. DNA oder RNA.

30 Proben im Sinne der Erfindung sind beispielsweise klinische Proben, wie Blut, Serum, Mundspülflüssigkeit, Urin, Zerebralflüssigkeit, Sputum, Stuhl, Punktate und Knochenmarkproben. Die Probe kann auch aus dem Bereich der Umweltanalytik, der Lebensmittelanalytik oder der molekularbiologischen Forschung, z. B. aus Bakterienkulturen, Phagenlysaten und Produkten von Amplifikationsverfahren, z. B. PCR, stammen.

35 40 Erfundungsgemäß haben die magnetischen Partikel einen inneren Kern, auf den die äußere Glasoberfläche aufgebracht ist. Bei dem Kern kann es sich um einen Verbundstoff, jedoch auch um einfache Eisenkerne handeln. Der Kern kann auch aus einer kristallinen oder keramischen oder glasartigen Struktur bestehen, in die Eisenoxid eingelagert ist.

Mit dem geschilderten Verfahren kann natives oder modifiziertes biologisches Material isoliert werden. Unter nativem biologischem Material wird Material verstanden, dessen Struktur gegenüber den natürlich vorkommenden biologischen Materialien nicht irreversibel verändert wurde. Dies schließt jedoch nicht die Modifizierung anderer Bestandteile der Probe aus. Sollen beispielsweise Zellen isoliert werden, so kann zwar das die Zellen umgebende Medium modifiziert sein, nicht jedoch die Zellen als solche. Sollen Nukleinsäuren isoliert werden, so sollen auch diese in der nativen Form, d. h. nicht denaturiert, geschnitten oder durch Ankoppelung reaktiver Gruppen modifiziert sein. Der Begriff natives biologisches Material umfaßt daher insbesondere biotinylierte Nukleinsäuren nicht.

45 50 Modifizierte biologische Materialien umfassen Materialien, die nicht in der Natur vorkommen, z. B. Nukleinsäuren, die durch Anheftung reaktiver, nachweisbarer oder zur Immobilisierung befähigenden Gruppen modifiziert sind, z. B. biotinylierte Nukleinsäuren.

In bestimmten Fällen kann die Probe ohne Vorbehandlung in das erfundungsgemäße Isolierungsverfahren eingesetzt werden. In vielen Fällen sollte die Probe jedoch durch eine geeignete Methode aufgeschlossen und das in der Probe enthaltende biologische Material freigesetzt werden. Verfahren zum Aufschluß von Proben sind dem Fachmann bekannt und können chemischer, enzymatischer oder physikalischer Natur sein. Auch eine Kombination dieser Verfahren ist möglich. Beispielhaft genannt sei Lyse durch Ultraschall, Hochdruck oder durch Scherung, durch Alkali, Detergenzen oder chaotropie Salzlösungen, oder durch Einwirkung von Proteinasen oder Lipasen. Speziell im Hinblick auf die Aufschlußverfahren zum Erhalt von Nukleinsäuren wird auf Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Addition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY und Ausubel et al.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY, verwiesen.

55 60 65 Die Probe kann neben dem zu isolierenden biologischen Material weitere Bestandteile, z. B. Zelltrümmer, Proteine, Salze und weitere nicht zu isolierende Stoffe in einer Flüssigkeit enthalten. Diese Probe, die bevorzugt das biologische Material in nativer Form enthält, wird unter Bedingungen, bei denen das gewünschte biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, mit den Partikeln in Kontakt gebracht. Die Bedingungen hierfür hängen von der Art des biologischen Materials ab, sind jedoch prinzipiell bekannt. Sie richten sich auch nach der Art der Bindung, über die das biologische Material an die Oberfläche gebunden wird. Sollen beispielsweise immunologische Wechselwirkungen für die Bindung ausgenutzt werden, so müssen Bedingungen gewählt werden, die über die Bildung von Immunkomplexen geeignet sind. Für Nukleinsäuren ist im Fall der modifizierten Nukleinsäuren eine Bindung über die Gruppen der Nukleinsäuren möglich, die die Modifizierung darstellen, z. B.

Biotin über die Bindung an mit Streptavidin beschichtete Oberflächen. Insbesondere bei Nukleinsäuren ist jedoch der Fall der direkten Bindung von Nukleinsäuren an Glas bevorzugt, unter anderem deshalb, weil sich eine Modifizierung der Nukleinsäuren erübrigert und schon native Nukleinsäuren gebunden werden können. Die Bindung nativer Nukleinsäuren an Glaspartikel kann analog zu Verfahren des Standes der Technik erfolgen. Bevorzugt erfolgt sie in Gegenwart chaotroper Salze, wobei die Konzentration dieser Salze zwischen 2 und 8 mol/l beträgt, bevorzugt 4 bis 6 mol/l. Bei chaotropen Salzen handelt es sich z. B. um Natriumjodit, Natriumperchlorat, Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumisothiocyanat oder Guanidiniumhydrochlorit, ist jedoch nicht auf diese Verbindungen beschränkt.

Zum Inkontaktbringen der Probe mit den Partikeln wird die Probe mit den Partikeln vermischt und für eine für die Bindung ausreichende Zeit inkubiert. Die Länge der Inkubation ist dem Fachmann in der Regel aus der Behandlung mit nicht-magnetischen Partikeln bekannt, eine Optimierung ist durch Durchführung einer Bestimmung der Menge an immobilisiertem biologischem Material an der Oberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten möglich. Für Nukleinsäuren können Inkubationszeiten zwischen 1 und 30 Minuten zweckmäßig sein.

Je nach Größe und Art der magnetischen Partikel findet schon während der Inkubationszeit eine Separation der Partikel von der Flüssigkeit statt oder erhält sich die Suspension über längere Zeit. Wenn die Partikel eine sehr kleine Korngröße aufweisen und superparamagnetisch sind, erhält sich die Suspension über einen längeren Zeitraum. Handelt es sich um Partikel mit einer größeren Korngröße, so findet bereits während der Inkubation eine langsame Separation der Partikel von der Flüssigkeit statt. Insbesondere wenn es sich um ferromagnetische Partikel handelt, bilden sich solche Aggregate. Für den bevorzugten Fall, daß die ferromagnetischen Partikel nicht vormagnetisiert sind, ist eine besonders schonende Separation gewährleistet.

Die Immobilisierung findet bevorzugt nicht durch Ausführung durch Erniedrigung der Löslichkeit der zu immobilisierten Materialien statt. Statt dessen beruht die Immobilisierung auf biospezifischen Wechselwirkungen (Fang-Moleküle) oder Adsorption. Dies vermeidet weitgehend unspezifische Einschlüsse von Verunreinigungen.

Nach der Inkubation erfolgt die Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit. Dies wird allgemein durch die Separation des an die magnetischen Partikel gebundenen Materials mit Hilfe eines Magnetfeldes erreicht. Beispielsweise können die Magnetpartikel an die Wand des Gefäßes, in welchem die Inkubation stattgefunden hatte, gezogen werden. Daraufhin kann die Flüssigkeit mit den Inhaltsstoffen der Probe, die nicht an die magnetischen Partikel gebunden wurden, entfernt werden. Diese Entfernung hängt von der Art des Gefäßes ab, in dem die Inkubation stattgefunden hat. Geeignete Verfahrensschritte sind Abpipettieren oder Absaugen der Flüssigkeit.

Danach können die magnetischen Partikel gewünschtenfalls ein- oder mehrmal mit einer Waschlösung gereinigt werden. Die Waschlösung wird so gewählt, daß eine Ablösung des biologischen Materials von der Partikeloberfläche möglichst nicht stattfindet, jedoch nicht zu isolierende Verunreinigungen möglichst gut weggewaschen werden. Dieser Waschschnitt findet bevorzugt durch Inkubation der Waschlösung mit den Partikeln statt, wobei bevorzugt eine Resuspension der Partikel vorgenommen wird, z. B. durch Schütteln oder Anlegung eines nicht mit dem ersten Magnetfeld identischen Magnetfeldes. Die verunreinigte Waschlösung wird bevorzugt genauso entfernt wie die Probe in dem oben genannten Schritt zur Bindung des biologischen Materials.

Im Anschluß an den letzten Waschschnitt kann ein kurzer Trocknungsschritt der magnetischen Partikel im Vakuum oder durch Durchsaugen von Luft vorgenommen werden, wobei auch eine Vorbehandlung mit Aceton möglich ist.

Das so gereinigte biologische Material kann, falls gewünscht, von den magnetischen Partikeln entfernt werden. Auch dieser Schritt richtet sich nach der Art der Bindung des biologischen Materials an die magnetischen Partikel. Für den Fall, daß es sich bei dem biologischen Material um native Nukleinsäuren und bei den magnetischen Partikeln um glasüberzogene Partikel handelt, kann die Nukleinsäure mittels eines Elutionspuffers mit niedrigem Salzgehalt von den erfundungsgemäßen Partikeln entfernt werden. Solche Puffer sind aus DE 37 24 442 und Analytical Biochemistry 175, 196–201 (1988) bekannt. Als Elutionspuffer mit niedrigem Salzgehalt werden insbesondere Puffer mit einem Gehalt von weniger als 0,2 mol/l eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der Elutionspuffer Tris. In einer anderen besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Elutionspuffer um entmineralisiertes Wasser.

In einer weiteren Ausführungsform kann das beschriebene Reinigungs- und Isolierungsverfahren im Anschluß an eine immunomagnetische Separation von Zellen (z. B. virale Partikel oder prokariotische bzw. eukaryotische Zellen) aus einer Körperflüssigkeit oder einem Gewebe erfolgen. Hierzu wird die Probe mit magnetischen Beads, an welche ein Antikörper gegen ein Antigen auf der Zelle immobilisiert ist, unter Schütteln inkubiert. Solche Beads können erfundungsgemäß Partikel sein, aber auch kaufliche (z. B. MACS Microbeads der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, BRD). Nach Anlegen eines Magnetfeldes erfolgen ein oder mehrere Waschschnitte mit einer salzhaltigen Waschlösung. Man erhält Partikel, an welche die gewünschten Zellen gebunden sind. Schließlich werden die gebundenen Zellen in einem salzhaltigen Puffer resuspendiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser salzhaltige Puffer eine chaotrope Salzlösung, so daß die in der Zelle vorhandenen Nukleinsäuren aus den Zellen freigesetzt werden.

Durch Kombination der oben beschriebenen Isolierung von Zellen mit der ebenfalls beschriebenen Isolierung von Nukleinsäuren, bevorzugt in ihrer nativen Form, an den erfundungsgemäßen magnetischen Partikeln, ergibt sich ein besonders vorteilhaftes Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus zellhaltigen Proben. Vorteil dieser Ausführungsform ist die mögliche Einfachheit (Single-Tube-Methode), hohe Sensitivität (besonders wichtig in der medizinischen Mikrobiologie und Onkologie) und die leichte Automatisierbarkeit.

Die als Folge der erfundungsgemäßen Verfahren isolierten biologischen Materialien können nun in beliebiger Weise weiter verwendet werden. Beispielsweise können sie als Substrat für verschiedene enzymatische Reaktionen verwendet werden. Im Falle der Nukleinsäuren seien als Beispiel die Sequenzierung, die radioaktive oder

nicht-radioaktive Markierung, die Amplifikation einer oder mehrerer in ihr enthaltender Sequenzen, die Transkription, die Hybridisierung mit markierten Sondennukleinsäuren, die Translation oder die Ligation genannt. Ein Vorteil des erfundungsgemäßen Verfahrens ist, daß die Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit sehr einfach ist. Im Stand der Technik wurde zur Separierung von Glaspartikeln von Verunreinigungen entweder ein Zentrifugationsschritt angewandt, oder im Falle der Bindung des biologischen Materials an Glasfiberfilter die Flüssigkeit durch diese Flüssigkeit gesaugt. Hierbei handelt es sich um einen limitierenden Schritt, der die Verarbeitung von großen Probenzahlen behindert.

Mit den erfundungsgemäßen Partikeln ist eine effektivere Abtrennung der biologischen Materialien von Verunreinigungen möglich. Insbesondere können Inhibitoren für bestimmte enzymatische Reaktionen erfundungsgemäß in besonders gutem Umfang entfernt werden.

In Fig. 1 ist eine Isolierung von Nukleinsäuren aus einer zellhaltigen Probe schematisch dargestellt. Die Probe (Specimen), welche Zellen enthält, wird probenspezifisch so vorbehandelt, daß die Zellen, in denen die Nukleinsäuren nachgewiesen werden sollen, in geeigneter Form vorliegen. Hierzu gehört z. B. bei Proben, welchen Körperflüssigkeiten entnommen wurden, die Zugabe von Reagenzien, z. B. zur Verflüssigung von zähflüssigen Proben, z. B. Speichelproben. Der so vorbereiteten Probe wird in einem Gefäß ein an eine Festphase, bevorzugt an eine Perle (Bead) gebundener Antikörper zugegeben, welcher die Zelle erkennen und binden kann. Als geeignete Partner für den Antikörper haben sich beispielsweise Antigene auf der Zelloberfläche erwiesen. Die Spezifität des Antikörpers kann sich nach der Spezifität der zu lösenden Analyseaufgabe richten. Wenn es sich bei der Festphase um die Wand des Gefäßes handelt, werden die Zellen direkt an die Wand gebunden. Für den Fall, daß es sich bei den Festphasen um eine Perle handelt, werden diese durch geeignete Separationsmethoden von der Flüssigkeit separiert. Dies kann beispielsweise durch Filtration geschehen. Im Falle von magnetischen Perlen ist eine Abtrennung durch Anlegen eines Magnetfeldes an die Außenwand des Gefäßes möglich. Die separierten Zellen werden mit einer Flüssigkeit gewaschen, um Verunreinigungen, welche den Nachweis stören würden, mit dem die Zellen umgebenden Medium zu entfernen. Bevorzugt werden Bedingungen eingesetzt, bei denen die Zellen weder von der Festphase gelöst noch zerstört werden. Anschließend findet die Zerstörung der Zellen statt, die sogenannte Lyse. Eine Möglichkeit ist durch die Behandlung der Zellen mit chaotropen Salzen gegeben. Andere Möglichkeiten sind die Einwirkung von Proteinase und Detergenzien.

Zu der Lysemischung werden in der bevorzugten Ausführungsform die erfundungsgemäßen Partikel zugegeben. Nach einer geeigneten Einwirkungszeit, die über die Beladung der Oberfläche mit Nukleinsäuren optimiert werden kann, werden die Partikel von der sie umgebenden Flüssigkeit, die weitere und nicht nachzuweisende Zellbestandteile enthält, getrennt. Dies geschieht wiederum bevorzugt durch Anlegen eines magnetischen Feldes mittels eines Magneten an der Gefäßwand.

Um eventuell noch anhaftende Verunreinigungen zu entfernen, wird bevorzugt mit einer Flüssigkeit gewaschen, die so ausgewählt wird, daß die zu bestimmenden Nuklesäuren sich nicht von der Glasoberfläche ablösen. Zur Entfernung der Nukleinsäuren von der Glasoberfläche wird ein sogenannter Elutionspuffer zugegeben, der Reagenzbedingungen aufweist, unter denen sich die Nukleinsäuren von der Glasoberfläche lösen. Dies sind insbesondere Niedrigsalzbedingungen. Je nach beabsichtigter Weiterbehandlung der Nukleinsäuren kann die Flüssigkeit nun von den Partikeln getrennt und weiterbearbeitet werden. Es ist bevorzugt, diese Abtrennung bei anliegendem Magnetfeld vorzunehmen, so daß die Partikel separiert vorliegen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1

Herstellung der erfundungsgemäßen magnetischen Partikel

Es wurden 6 verschiedene Sole verwendet. Die Herstellung der Sole wurde nach folgenden Schemata durchgeführt:

Sol 1 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 7 : 3$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

86,6 ml Tetraethylorthosilikat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 14,1 ml 0,15 M HCl.

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von + 37,8 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50°C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 14,1 ml 0,15 M HCl

Sol 2 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4 : 1$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilikat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 16,3 ml 0,15 M HCl.

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von + 25,6 ml Trimethylborat.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50°C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl

Sol 3 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 85 : 15$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Rühren durchgeführt.

107,8 ml Tetraethylorthosilikat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
+ 17,5 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 19,4 ml Trimethylborat.
Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50°C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 17,5 ml 0,15 M HCl
Sol 4 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1; 2 \text{ Mol\% P}_2\text{O}_5$):

Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Röhren durchgeführt.
100,5 ml Tetraethylorthosilicat

+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol
+ 16,3 ml 0,15 M HCl

Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 25,6 ml Trimethylborat.
Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50°C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl
+ 1,63 g P_2O_5

Sol 5 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1 \text{ Mol\% Al}_2\text{O}_3$):
Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Röhren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilicat
+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 16,3 ml 0,15 M HCl
Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 25,6 ml Trimethylborat.
Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50°C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl
+ 3,06 g AlCl_3

Sol 6 ($\text{SiO}_2:\text{B}_2\text{O}_3 = 4:1 \text{ Mol\% ZrO}_2$):
Die Synthese wurde in einem 250 ml Rundkolben unter ständigem Röhren durchgeführt.

100,5 ml Tetraethylorthosilicat
+ 7 ml wasserfreies unvergälltes Ethanol

+ 16,3 ml 0,15 M HCl
Es entsteht ein zweiphasiges Gemisch, welches bei Raumtemperatur solange gerührt wird, bis es einphasig wird. Danach erfolgt tropfenweise die Zugabe von

+ 25,6 ml Trimethylborat.
Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50°C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von

+ 16,3 ml 0,15 M HCl
+ 5,15 ml Zirkon(IV)-proylat, 70 Gew.% Lsg in 1-Propanol.

Anschließend wird das Sol 2 Stunden bei 50 °C gehalten. Danach erfolgt die Zugabe von
+ 16,3 ml 0,15 M HCl.

Nach weiteren 2 Stunden bei 50°C wurde in jeweils 150 ml der Sole 22,5 g Iridin 600 (Black Mica) eingerührt und anschließend mit einem Sprühtrockner (Büchi 190, Mini Spray Dryer) beschichtet. Die Düsentemperatur des Sprühtrockners betrug 134°C.

Durch den Sprühtrockenprozeß erhaltene Pulver wurde anschließend einer Temperaturbehandlung unter Stickstoffatmosphäre (90 l/h) unterzogen. Die Aufheizgeschwindigkeit betrug hierbei 1 k/min und die Haltezeit betrug 2 Stunden bei der erreichten Maximaltemperatur. Diese Temperatur lag bei der Beschichtung mit Sol 1 bei 750°C, bei der Beschichtung mit Sol 2 bei 860°C und bei den übrigen Beschichtungen bei 800°C. Nach dem Sinterprozeß wurde der Ofen abgeschaltet und das Pulver auf Raumtemperatur abgekühlt.

Patentansprüche

1. Magnetische Partikel mit einer äußeren Glasoberfläche, die im wesentlichen porenfrei ist oder Poren eines Durchmessers von weniger als 10nm aufweist.

2. Ferromagnetische Partikel mit einer Glasoberfläche.
3. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Korngröße von zwischen 10 und 55 µm haben.

4. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eventuell in der Oberfläche vorhandene Poren einen Durchmesser von weniger als 1 nm haben.

5. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen Verbundstoff aus einem Kern aus Glimmer und darauf immobilisierten Magnetitpartikeln enthalten, wobei dieser Verbundstoff von einer Glasschicht umschlossen ist.

6. Verfahren zur Isolierung eines biologischen Materials durch
— Inkontaktbringen einer Probe, die das biologische Material in einer Flüssigkeit enthält, mit Partikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 unter Bedingungen, bei denen das biologische Material an die Partikeloberfläche bindet, und

— Abtrennung des biologischen Materials von der Flüssigkeit.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem biologischen Material um Nukleinsäuren handelt.

8. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren durch
— Inkontaktbringen einer Probe, welche die Nukleinsäure in nativer Form in einer Flüssigkeit enthält, mit magnetischen Partikeln mit Glasoberflächen unter Bedingungen, bei den die Nukleinsäuren in nativer Form an die Glasoberfläche binden können und
— Abtrennung der gebundenen Nukleinsäuren von der Flüssigkeit.
- 5 9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung mit Hilfe eines Magneten geschieht.
- 10 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel beim Inkontaktbringen mit der Probe nicht vormagnetisiert sind.
11. Verfahren zur Herstellung magnetischer Glaspartikel durch
— Bereitstellung eines magnetischen Kernes und
— Umschließen des magnetischen Kernes mit einer im wesentlichen porenfreien Glasoberfläche.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Umschließen die Abscheidung eines Sols auf der Oberfläche und das anschließende Verdichten des Sols beinhaltet.
13. Verwendung ferromagnetischer Glaspartikel zur Isolierung von Nukleinsäuren in nativer Form.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

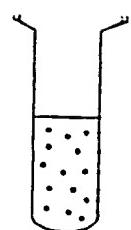
60

65

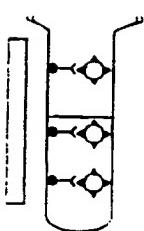
- Leerseite -

FIG 1

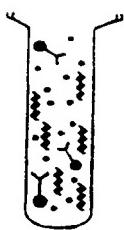
Specimen



Zugabe von Bead-AK-Komplex

Specimen-Spezif.
Vorbehandlung

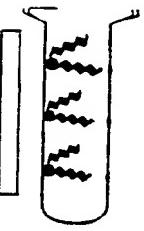
Waschen



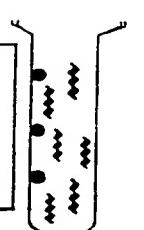
Lysis der Zellen mit chaotropen Salzen



Zugabe von magn. Glaspartikeln



Magnet. Separation von NA-Glaspartikel-Komplex

Waschen
Zugabe von Elutionspuffer

Elution von NAs

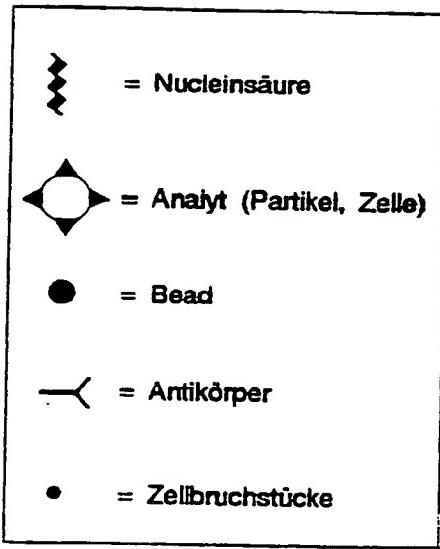
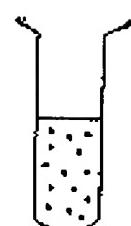
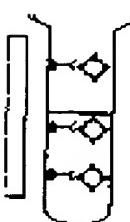
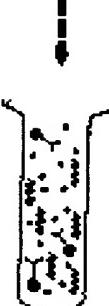


FIG 1

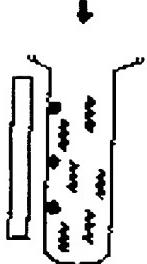
Specimen

Zugabe von
Bead-AK-KomplexSpecimen-Spezif.
VorbehandlungImmunomagn.
Separation

Waschen

Zugabe von
magn. Glaspartikeln

- = Nucleinare
- = Analyt (Partikel, Zelle)
- = Bead
- = Antikörper
- = Zellbruchstücke

Waschen
Zugabe von Elutionspuffer

Elution von NAs



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)